

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI

Diagnostica e Sanità Pubblica

SCUOLA DI DOTTORATO DI

Scienze Naturali e Ingegneristiche

DOTTORATO DI RICERCA IN

Nanoscienze e Tecnologie Avanzate

XXIX° ciclo/anno 2014

TITOLO DELLA TESI DI DOTTORATO

**Nuove strategie analitiche per la prevenzione degli
incidenti stradali alcol correlati nei conducenti di
autobus**

S.S.D. MED/43

Coordinatore: Prof. Franco Tagliaro

Tutor: Prof. Luciano Romeo

Dottorando: Dott. Marco Cavallini

INDICE

1. Introduzione	2
2. Abuso alcolico e lavoro: aspetti epidemiologici e legislativi.....	7
3. Strumenti oggettivi per la diagnosi di abuso alcolico	11
4. Studio Sperimentale	26
<u>4.1 Introduzione e scopo</u>	<u>26</u>
<u>4.2 Materiale e metodi</u>	<u>27</u>
<u>4.3 Analisi CZE-UV e HPLC-Fl dei Finger Prick Dried Blood Spot (fpDBS).....</u>	<u>29</u>
<u>4.4 Risultati e Discussione</u>	<u>36</u>
<u>4.5 Conclusioni</u>	<u>42</u>
5. Bibliografia	43

1. Introduzione

L'abuso alcolico costituisce da sempre un rilevante problema in termini di salute pubblica, con non trascurabili ricadute in ambito giudiziario e amministrativo.

All'interno della popolazione esiste una percentuale di persone astemie che non assumono alcol; esistono altresì bevitori "moderati" che consumano una quantità di alcol che permette loro di non incorrere in problemi di salute; infine esistono persone che fanno uso di una grande quantità di alcol occasionalmente o di quantità più limitate frequentemente, definite "forti" bevitori.

Secondo i dati ISTAT del 2014 il 63% della popolazione italiana di età superiore agli 11 anni consuma alcolici con una riduzione del consumo giornaliero a favore di un consumo occasionale e fuori dai pasti. Nel complesso i comportamenti a rischio nel consumo di alcol (consumo giornaliero non moderato, binge drinking, consumo giovanile) hanno riguardato nello stesso anno 8 milioni e 265 mila persone (15,2% della popolazione sopra gli 11 anni) in Italia.¹

Risulta comunque complesso definire una linea di demarcazione che separi i bevitori moderati dai forti in quanto la diagnosi differenziale tra uso di alcol ed abuso alcolico dipende dall'ambito di valutazione. Si distinguono infatti l'ambito clinico in cui l'uso di alcol viene considerato eccessivo quando si associa all'insorgenza di una malattia organica (es. steatosi/cirrosi epatica), l'ambito psico-sociale in cui l'uso di alcol è considerato pericoloso quando si associa a situazioni di disagio familiare, sociale, lavorativo ed infine i contesti di valutazione di idoneità psico-fisica alla guida, al lavoro, all'affidamento dei figli, etc., in cui l'uso di alcol è considerato pericoloso quando si associa ad un rischio specifico di intossicazione acuta. A seconda degli ambiti di valutazione saranno definiti livelli decisionali diversi per distinguere tra uso e abuso alcolico.^{2,3}

Relativamente all'ambito clinico, è ormai accertato che i problemi di salute insorgono quando la quantità di alcol assunta giornalmente raggiunge i 50-60g.^{4,5} Attualmente si ritiene che la dose massima giornaliera ammessa di alcol etilico sia di circa 40g/die per l'uomo e 25g/die per la donna (non gravida), che corrisponde, per un uomo di peso medio, a 1/2 litro di vino (di gradazione non superiore a 10°), oppure a 120 mL di acquavite (whisky, cognac, grappa ecc., di gradazione non superiore a 40°). Negli altri ambiti non è definito un limite preciso ad eccezione che nella valutazione dell'idoneità alla guida dove il limite di legge in Italia è fissato a 0,5 g/L e, per alcune categorie di guidatori (neo-patentati, possessori di patenti di categoria superiore), a zero [*decreto legislativo 30 aprile 1992, n. 285, e successive modificazioni*].

Il divieto di guida in stato di ebbrezza si fonda sull'evidenza scientifica che al progressivo aumento della concentrazione di alcol nel sangue (Blood Alcohol Concentration, BAC) corrisponde una progressiva compromissione delle abilità cognitive e di attenzione necessarie alla guida, come illustrato nella tabella 1.

Tabella 1 - BAC e disabilità alla guida.

BAC g/L	Disabilità
0,2	Insicurezza; iniziale allungamento dei tempi di reazione agli stimoli visivi
0,3	Iniziale riduzione del senso della profondità di campo (stereo-optometrico)
0,4	Riduzione del riflesso corneale e di abilità di guida a velocità sostenuta
0,5	Disabilità di guida nel 25%-30% dei conducenti
0,6	Iniziali alterazioni dell'equilibrio
0,8-1,2	Riduzione della capacità di adattamento all'oscurità; compromissione della coordinazione oculo-motoria
1,2-2	Riduzione dei tempi di reazione e disabilità di guida in tutti i conducenti; ebbrezza evidente; gravi disturbi dell'equilibrio; incapacità di valutare le distanze
2-3	Disorientamento; confusione mentale; diplopia; marcia instabile
3-4	Incapacità a mantenere la stazione eretta; stato stuporoso
>4	Coma, anestesia; areflessia

La correlazione tra livello alcolemico e rischio di incidente stradale è stata dimostrata per la prima volta su base epidemiologica nella prima metà degli anni '60 con il Grand

Rapid Study, che evidenziava come il rischio di incidente alcol-correlato diventasse significativamente maggiore in caso di alcolemia maggiore di 0,8 g/L.⁶ Gli studi condotti successivamente confermavano la correlazione tra BAC e rischio di incidente evidenziando come tale rischio diventasse significativo già con livelli alcolemici superiori a 0,5 g/L (Fig. 1).⁷

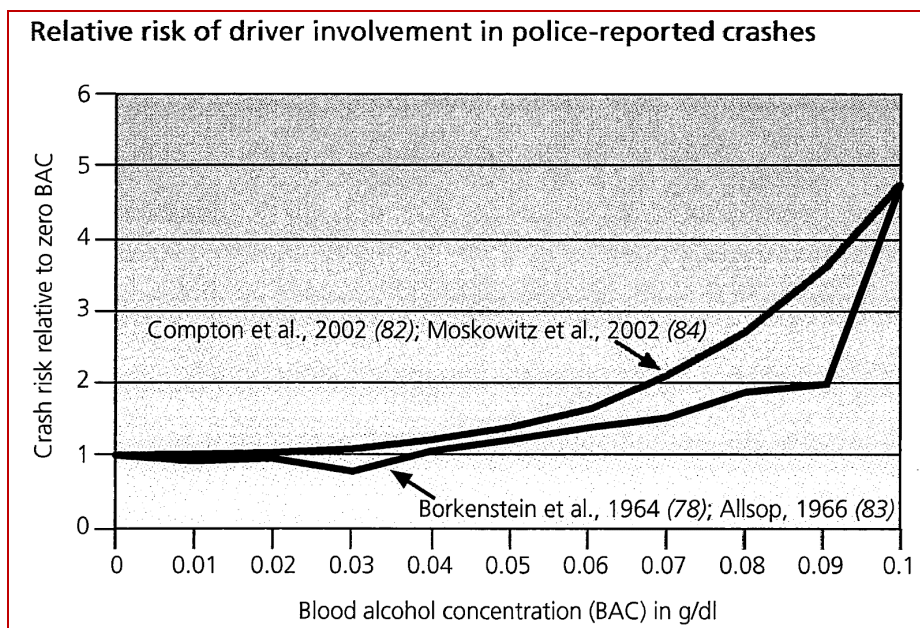


Fig. 1

In Europa l'alcol è stato collegato al 25% delle vittime della strada, uccidendo circa 10.000 persone all'anno. In Italia, secondo i dati raccolti dall'Istituto Superiore di Sanità, più del 30% degli incidenti stradali mortali o gravi sono causati dal consumo di bevande alcoliche.

Nonostante il rischio di incidente stradale alcol correlato sia ben noto, ancora molte persone si mettono alla guida dopo aver bevuto, come dimostrato dall'elevato numero di contravvenzioni ancora comminate per violazione dell'art. 186 NCS che nel 2015 sono state 42.857 (21.431 effettuate dalla Polizia Stradale, 16.693 dai Carabinieri 4.733 dalla Polizia Municipale).

Al riguardo emerge un dato interessante relativamente ai conducenti di autobus a cui nel 2015, secondo i dati dell'ACI, sarebbero state comminate 13 contravvenzioni per guida in stato di ebbrezza. Tale dato, da una parte rassicurante se si considera il numero totale di conducenti di autobus sul territorio italiano e il numero di corse in un anno, dall'altra pone l'accento su un fenomeno in realtà ancora poco studiato e cioè la correlazione tra abuso alcolico ed infortunio sul lavoro. In questo ambito, vi sono dei dati significativi solo relativamente agli infortuni in itinere (infortuni relativi ad incidenti stradali che si verificano nel tragitto tra casa e lavoro o viceversa), che comunque rappresentano attualmente una quota rilevante degli infortuni sul lavoro, soprattutto tra quelli mortali. Relativamente pochi dati sono invece disponibili sulla correlazione alcol-incidente relativamente alle categorie di lavoratori il cui lavoro consiste nella conduzione di mezzi (conducenti di mezzi pubblici, conducenti di mezzi pesanti, ...). Rispetto a questa categoria non solo non emergono studi direttamente mirati a valutare quanti infortuni/incidenti si verificano in condizioni di ebbrezza alcolica, ma non risulta neppure siano state implementate concrete strategie clinico-laboratoristiche atte ad individuare situazioni a rischio di infortunio/incidente sotto l'effetto di alcol. Tale carenza risulta apparentemente inspiegabile dato che il peso del rischio di incidenti alcol correlati è noto da più di 40 anni. In realtà la stessa è in parte spiegata da fattori culturali e in parte da aspetti legislativi. Nelle società moderne post-industriali il lavoratore dipendente è considerato una categoria da tutelare rispetto a tutto ciò che potrebbe ledere i suoi diritti. Investigare in maniera sistematica ed oggettiva condizioni di intossicazione acuta ed abuso cronico di alcol potrebbe portare alla sospensione del lavoro, al licenziamento, al mancato riconoscimento di indennizzo nel caso di infortunio sul lavoro. Di ciò risente anche la legislazione al riguardo che, come si vedrà nel

capitolo successivo, prevede accertamenti solo nel caso di forte sospetto clinico da parte del medico competente.

Dalle considerazioni sopra esposte nasce l'interesse scientifico nell'effettuare uno studio epidemiologico che vada ad indagare il trend di consumo alcolico nei lavoratori impegnati in aziende di trasporto allo scopo di sviluppare adeguati controlli volti al contenimento e alla prevenzione del fenomeno.

2. Abuso alcolico e lavoro: aspetti epidemiologici e legislativi

Con specifico riguardo ai conduttori di veicoli, di macchinari mobili e di sollevamento, relativamente agli anni 2012-2014, dalla Banca Dati delle Professioni INAIL disponibile on-line^{1a}, risulta che il numero di infortuni è piuttosto elevato, seppure caratterizzato da un trend di diminuzione nel triennio, con una percentuale non irrilevante di infortuni mortali (Tabella 2). Peraltro meno del 10% risulta essere un infortunio in itinere.

Infortuni sul lavoro definiti positivi per anno evento			
Anni: 2012 - 2014			
7.4 - Conduttori di veicoli, di macchinari mobili e di sollevamento			
	2012	2013	2014
Numero casi	31.461	26.147	24.435
di cui in itinere	2.444	1.848	1.640
Mortali con e senza superstiti	121	102	100
di cui in itinere	10	14	13

[Scarica](#)

Tabella 2: in <http://bdprofessioni.INAIL.it/bdp/jsp/reportCover.jsp?nup=7.4>

Secondo stime riportate in letteratura, fino al 40% degli infortuni lavorativi – soprattutto nel caso di incidenti durante la guida – sarebbe causato da sostanze d’abuso comprensive di alcol e droghe.⁸

L’International Labour Office (ILO) stima che tra i lavoratori vi sia un 3-5% di alcolisti/alcol-dipendenti e un 25% circa di bevitori a rischio.^{2a} Secondo le stime dell’OMS, la quota di infortuni sul lavoro alcol correlati si aggirerebbe intorno al 10-30% (10-16% secondo ILO e NIAAH, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism).^{3a} Una review della Rand Corporation – Center for Health and Safety in

Workplace restituisce percentuali di incidenti sul lavoro alcol correlati che variano in prevalenza tra 15-20%.⁹

Nonostante sia noto che il consumo rischioso di alcol determini un aumento del rischio di infortuni, si rileva, tuttavia, una certa difficoltà a quantificare l'associazione alcol/infortuni occupazionali per complessità metodologiche richieste e risultati di studi spesso non conclusivi; gli studi passati hanno infatti trascurato il rapporto tra infortuni non mortali e consumo cronico di alcol e si sono concentrati prevalentemente sull'intossicazione acuta e sugli infortuni mortali.¹⁰

Si sottolinea peraltro come l'uso eccessivo di alcol, oltre ad aumentare il rischio di infortuni, tende a determinare nel tempo una riduzione delle capacità e del rendimento lavorativo, un incremento dell'assenteismo (di 3-4 volte superiore), una maggiore dequalificazione, oltre che un 40% dei cambiamenti del posto di lavoro con aumentata possibilità di licenziamento. Le stime dei costi sociali ed economici diretti ed indiretti sono rilevanti, pari a circa 6-12 miliardi di euro l'anno.¹⁰

Relativamente agli aspetti legislativi, il primo riferimento normativo riguarda la legge 30 marzo 2001, n. 125 *“Legge quadro in materia di alcol e problemi alcol correlati* che all'art. 15 (*Disposizione per la sicurezza sul lavoro*) riporta:

“1. Nelle attività lavorative che comportano un elevato rischio di infortuni sul lavoro ovvero per la sicurezza, l'incolumità o la salute dei terzi, individuate con decreto del Ministro del lavoro e della previdenza sociale, di concerto con il Ministro della sanità, da emanare entro novanta giorni dalla data di entrata in vigore della presente legge, è fatto divieto di assunzione e di somministrazione di bevande alcoliche e superalcoliche.

2. Per le finalità previste dal presente articolo i controlli alcolimetrici nei luoghi di lavoro possono essere effettuati esclusivamente dal medico competente ai sensi dell'articolo 2, comma 1, lettera d), del decreto legislativo 19 settembre 1994, n. 626, e

successive modificazioni, ovvero dai medici del lavoro dei servizi per la prevenzione e la sicurezza negli ambienti di lavoro con funzioni di vigilanza competenti per territorio delle aziende unità sanitarie locali.

3. Ai lavoratori affetti da patologie alcol-correlate che intendano accedere ai programmi terapeutici e di riabilitazione presso i servizi di cui all'articolo 9, comma 1, o presso altre strutture riabilitative, si applica l'articolo 124 del testo unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza, ...”.

Secondo quanto previsto da questa legge alle categorie di lavoratori con mansioni a rischio per la salute di terzi (successivamente elencate nell'allegato 1 del provvedimento 16 marzo 2006 – n. 75 GU 30 marzo 2006) è fatto specifico divieto di assunzione e somministrazione di bevande alcoliche durante l'orario di lavoro. Per questo motivo i medici competenti e i medici del lavoro sono autorizzati a sottoporre tali categorie di lavoratori, durante l'orario di lavoro a controlli alcolimetrici. Tali disposizioni, di sicura importanza in termini di deterrenza, hanno tuttavia trovato limitata applicazione pratica per almeno due ragioni: la prima, di carattere fisiopatologico, riguarda la rapida scomparsa dell'etanolo dal sangue che di fatto rende scarsamente probabile l'identificazione di eventuali abusi alcolici sul luogo di lavoro tramite la determinazione dell'alcolemia; la seconda ragione, di carattere squisitamente organizzativo, riguarda la reale difficoltà, per il medico competente e del datore di lavoro, di organizzare controlli alcolimetrici a sorpresa. Tali oggettive difficoltà hanno fatto sì che tali disposizioni siano state applicate solo in casi limitati risultando l'abuso alcolico sul luogo di lavoro quasi mai efficacemente valutato/monitorato.

Il secondo riferimento normativo riguarda l'art. 41 del D.L. 81 del 2008
“Attuazione dell'art. 1 della legge 3 agosto 2007, n. 123, in materia di tutela della

salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro". In questo articolo "Sorveglianza Sanitaria", è prevista la possibilità nel corso delle visite mediche di preassunzione per la valutazione all'idoneità della mansione (comma 2.a), delle visite mediche periodiche (comma 2.b), delle visite mediche in occasione del cambio di mansione (comma 2.d), delle visite mediche preventive in fase preassuntiva (2 e bis) e delle visite mediche precedenti la ripresa del lavoro, a seguito di assenza per motivi di salute (2 e ter) la verifica di assenza di condizioni di alcol dipendenza e di assunzione di sostanze psicotrope e stupefacenti. Tale disposizione, rispetto a quanto previsto dalla legge precedente, permette al medico competente maggiore libertà di azione, sebbene l'attuazione di strategie diagnostico-preventive deve comunque avvenire in accordo con le parti sociali.

3. Strumenti oggettivi per la diagnosi di abuso alcolico

La diagnosi di abuso alcolico è un argomento molto complesso che presenta specifiche peculiarità a seconda dell'ambito in cui è richiesta.

In linea generale, si distinguono due approcci principali alla problematica della diagnosi di abuso alcolico: il primo prevede una distinzione tra diagnosi di intossicazione alcolica acuta e abuso cronico o ripetuto di alcol; il secondo approccio prevede invece la distinzione tra trait markers e state markers, dove i primi sono delle caratteristiche geneticamente trasmesse (come un determinato profilo biochimico, l'attività modificata di un sistema enzimatico o di un sistema di neurotrasmettitori) che predisporrebbero i soggetti allo sviluppo di problemi alcol-correlati, mentre i secondi sono degli indicatori di una condizione di abuso in atto (sia acuto che cronico). Gli state markers a loro volta si distinguono in marcatori chimici, rappresentati essenzialmente dall'alcol etilico e congeneri e biochimici, correlati alle modificazioni indotte dal consumo cronico o comunque ripetuto di alcol etilico.¹¹

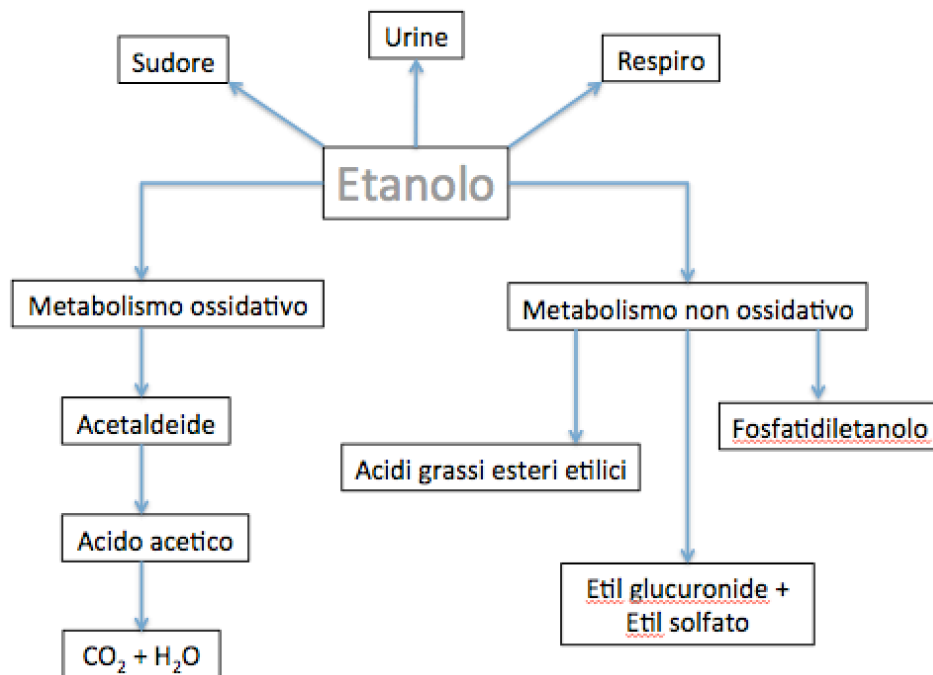
L'etanolo è una piccola molecola idrosolubile che dopo assunzione viene rapidamente e completamente assorbita dallo stomaco e dall'intestino tenue. Il picco alcolemico è usualmente raggiunto entro un'ora. Tramite il sangue, l'etanolo si distribuisce rapidamente nel compartimento idrico corporeo.

L'entità della distribuzione tissutale dipende dunque dalla dose introdotta, dal peso corporeo del soggetto e da una costante che correla con l'età, il sesso, la composizione corporea, in particolare il rapporto tra massa magra e massa grassa. Questo è il motivo per il quale l'alcolemia, dalla quale dipendono gli effetti acuti della sostanza, risulta

essere più elevata in soggetti femminili e in tutti coloro che hanno una maggior massa grassa, a parità di dose introdotta.

La maggior parte (oltre il 90%) dell'etanolo viene metabolizzata nell'organismo, mentre una piccola parte viene escreta immodificata tramite le urine, il sudore e l'aria espirata (Grafico 1).

Grafico 1 - Schema delle diverse vie metaboliche seguite dall'etanolo.



Il metabolismo dell'etanolo avviene approssimativamente ad una velocità di 0,1 g per kg di peso corporeo all'ora¹². Esso inizia già nello stomaco, ma per lo più avviene nel fegato tramite una serie di reazioni di ossidazione. La prima tappa del metabolismo è rappresentata dalla trasformazione dell'etanolo ad acetaldeide, metabolita intermedio reattivo e tossico, per la maggior parte ad opera dell'enzima alcol deidrogenasi (ADH) gastrica ed epatica. L'acetaldeide viene successivamente convertita in acido acetico dall'acetaldeide deidrogenasi (ALD), enzima mitocondriale NAD⁺ dipendente.

Un altro sistema che metabolizza l'etanolo è il MEOS (sistema microsomiale di ossidazione dell'etanolo). In condizioni normali esso svolge un ruolo minore rispetto al

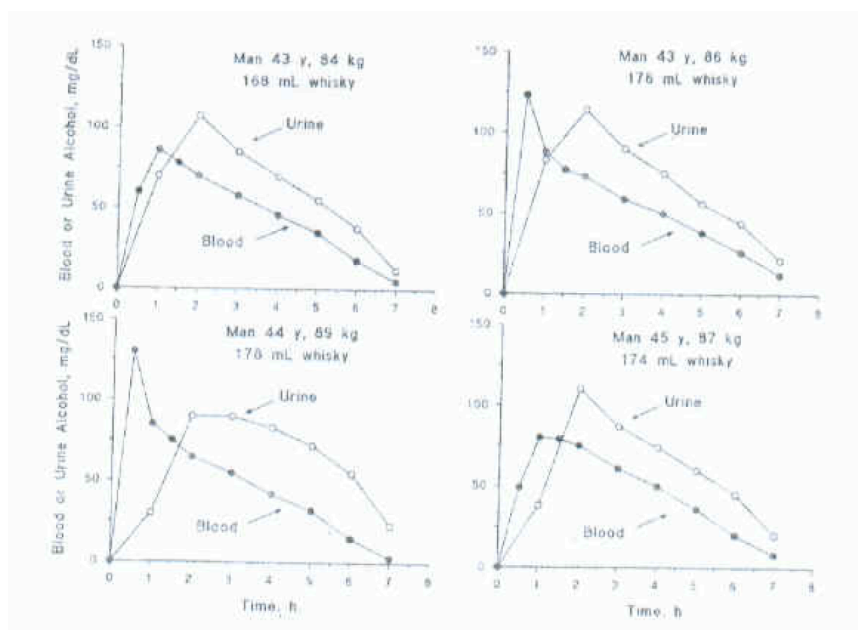
precedente, potendo tuttavia essere indotto nell'etilista cronico, con conseguenti alterazioni della capacità detossificante nel fegato. Questa via coinvolge il CYP2E1, enzima appartenente al complesso del citocromo P450, sito a livello del reticolo endoplasmatico liscio degli epatociti.

Infine esiste una terza via mediata dall'enzima perossisomale catalasi, meccanismo di importanza sicuramente marginale rispetto agli altri due. L'acetato che deriva da queste vie metaboliche viene condotto per via ematica ad altri tessuti ed attivato ad acetil-CoA, substrato energetico che può essere introdotto nel ciclo di Krebs o essere trasformato in corpi chetonici se presente in eccesso. L'acetil-CoA può inoltre essere utilizzato per la formazione di acidi grassi, i quali vengono immagazzinati sotto forma di trigliceridi.

Una minima parte dell'etanolo assorbito (<1%) va invece incontro a metabolismo non ossidativo, subendo una serie di reazioni di coniugazione che portano alla formazione in primo luogo di etil-glucuronide ed etil-solfato. Metaboliti minori che derivano da questa via sono gli esteri etilici degli acidi grassi ed il fosfatidiletanolo.¹³

Oltre il 90% dell'alcol viene ossidato nel fegato prima ad acetaldeide, poi ad acetato ed infine trasformato in anidride carbonica ed acqua; la restante parte viene escreta attraverso polmoni ed urine. L'alcol etilico viene quindi rapidamente eliminato secondo le curve di eliminazione sotto riportate (Grafico 2).

Grafico 2 - Concentrazione di etanolo nel sangue e nell'urina in relazione al tempo.¹³



In considerazione degli aspetti farmacocinetici appena menzionati, il rilievo di alcol etilico nel sangue o nel respiro indica che il soggetto in quel momento è sotto l'effetto di alcol, per cui di fatto l'alcol nel sangue o nel respiro è un indicatore di intossicazione alcolica acuta.

Relativamente alla diagnosi di abuso alcolico o comunque ripetuto di alcol etilico, a breve, medio e lungo termine, si dovrà invece fare riferimento ai marcatori biochimici che possono essere classificati come segue¹¹⁻¹⁶:

1.METABOLITI NON OSSIDATIVI DELL'ALCOL ETILICO

- Etilglucuronide
- Esteri etilici degli acidi grassi (FAEE)
- Fosfatidiletanolo (Peth)
- Cocaetilene

2. PRODOTTI DELL'ACETALDEIDE

- Addotti proteici dell'acetaldeide
- Salsolinol

3. PRODOTTI DELL'ALTERAZIONE METABOLICA ALCOL INDOTTA

- Carbohydrate Deficient Transferrin
- 5-Idrossitriptofolo

4. MARCATORI DI DANNO D'ORGANO ALCOL CORRELATO

GGT, MCV, ALT, AST

Etilglucuronide

E' una piccola molecola (PM 222 g/mol) non volatile e solubile in acqua, metabolita minore dell'etanolo che si forma a seguito della coniugazione dell'etanolo con l'acido glucuronico a livello epatico. Secondo la letteratura una percentuale inferiore allo 0,1 % di etanolo segue questa via metabolica. Quale metabolita diretto dell'etanolo è un marker di abuso alcolico altamente specifico, rilevabile nel sangue, urine e capelli con diverse finestre diagnostiche.

Esteri Etilici degli acidi grassi (FAEE)

Sono stati proposti come mediatori tossici di danno cellulare alcol indotto. La formazione di questi metaboliti è stata attribuita all'attività di due enzimi: acilCoA-etanolo-O-aciltransferasi (AEAT) e FAEE-sintasi. Rappresentano utili markers di consumo di etanolo a lungo e breve termine, potendo indicare sia un abuso recente, sia un consumo cronico. Le loro concentrazioni ematiche hanno un andamento pressochè parallelo a quello dell'etanolo quando superiore a 1,5 g/L, raggiungendo un picco tra 1 e 3 µM/L, con un'eliminazione più lenta anche a seguito di un'assunzione acuta (sono ancora rilevabili 24 ore dopo un'ingestione acuta) fino a 99 ore se associata a consumo cronico. Nel sangue vengono proposti come markers di consumo recente; una loro determinazione a distanza di 24 ore dall'ultima assunzione può essere impiegata per

differentiare alcolisti cronici dai forti consumatori occasionali (binge drinkers), tuttavia la tecnica complessa di analisi ne preclude la misura di routine.^{14,15} La loro determinazione nel capello è stata suggerita nella diagnosi di abuso cronico o nel monitoraggio dell'astinenza.¹⁶

Fosfatidiletanolo (PEth)

Rappresenta un gruppo di glicerofosfolipidi anomali che si formano nelle membrane cellulari per transfosfatilazione dalla fosfatidilcolina in presenza di etanolo. La reazione è catalizzata dalla fosfolipasi D. PEth si forma nelle membrane cellulari dopo circa due settimane di ripetuto ed importante abuso alcolico. L'emivita nel sangue a seguito di astinenza è di circa 4 giorni. E' stato proposto come marker a breve-medio termine data l'elevata specificità diagnostica.

Cocaetilene

Si forma in caso di contemporanea assunzione di cocaina ed alcol etilico. E' un metabolita attivo della cocaina che ne incrementa gli effetti sia sul sistema nervoso centrale che su quello cardiovascolare.

Addotti dell'acetaldeide (WBAA: Whole blood associated acetaldehyde)

L'acetaldeide è il primo prodotto dell'ossidazione dell'etanolo, ma la sua emivita è troppo breve per essere utile come marcatore di consumo di alcol. Sia l'alcol che l'acetaldeide però, possono formare addotti chimici con una varietà di substrati biologici (ammine, proteine plasmatiche, albumina, emoglobina, proteine intracellulari, lipoproteine), trasformandosi dapprima in intermedi quali le basi di Schiff e da questi nei prodotti stabili. Tali prodotti sono presenti nei consumatori di alcol, ma non negli

astemi e possono persistere per circa 2 settimane dall'ultima assunzione di alcol. Potrebbero invece essere utili per la diagnosi differenziale per discriminare patologie epatiche alcoliche da quelle non alcoliche¹⁷ e nel monitoraggio dell'astinenza di alcolisti in trattamento, ma grosse difficoltà metodologiche ne hanno finora limitato l'applicazione routinaria.¹⁵

Salsolinol

Prodotto di condensazione dell'acetaldeide con la dopamina di significato controverso, essendo stato proposto un suo ruolo come falso neuromediatore.

5-idrossitriptofolo (5-HTOL)

Si tratta di un prodotto di degradazione della serotonina la cui produzione risulta usualmente inferiore a quella dell'acido 5-idrossiindolacetico (5-HIAA), anch'esso prodotto di degradazione della serotonina. Il rapporto quantitativo tra i due si inverte in presenza di abuso alcolico. L'inversione del rapporto è utilizzata come marcatore di abuso alcolico cronico.

Carbohydrate Deficient Transferrin (CDT)

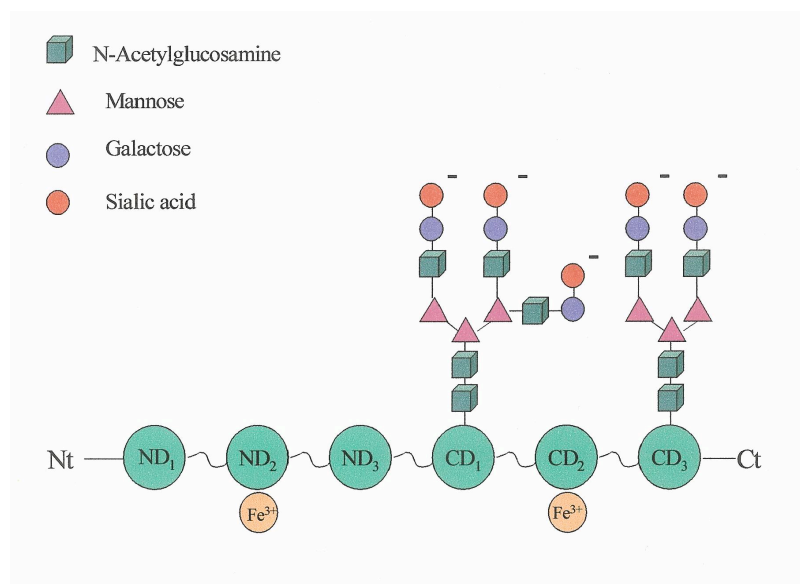
Il termine CDT, acronimo di Carbohydrate Deficient Transferrin, individua due glicoforme sieriche della transferrina (asialo-Tf e disialo-Tf) caratterizzate dalla presenza di un minor numero di catene glicaniche rispetto alla norma. La minore glicosilazione della transferrina correla con l'assunzione cronica di un ingente quantitativo di etanolo, anche se il meccanismo patogenetico rimane ancora oscuro.

La transferrina (Tf), la più importante proteina di trasporto del ferro, è sintetizzata primariamente negli epatociti. Essa migra in elettroforesi assieme alla frazione delle â-

globuline ed è costituita da tre domini strutturali: una catena polipeptidica singola, due siti di legame per il ferro indipendenti (uno N-terminale ed uno C-terminale) e due catene glicaniche molto complesse al capo N-terminale della molecola. Tali strutture sono molto variabili anche in condizioni fisiologiche e sono formate da 4 carboidrati diversi: N-acetilglucosamina, mannosio, galattosio ed acido sialico (come rappresentato nel grafico 3).¹⁸

L'acido sialico è l'unico residuo carico negativamente ed è sempre posizionato alla fine della catena glicanica. Possono essere presenti da 1 a 7 residui di acido sialico per molecola di Tf con una variazione del pI di 0,1 unità di pH per ogni residuo di acido sialico presente.¹⁹

Grafico 3 - Rappresentazione schematica delle catene glucidiche ramificate legate al dominio C-terminale della transferrina.



La transferrina è fortemente microeterogenea. L'isoforma più comune è la tetrasialo-Tf (pI 5,4) caratterizzata dalla presenza di 4 molecole di acido sialico, 2 per ogni catena glicanica.²⁰ Sono eterogenee anche le due catene N-glicaniche che presentano 2, 3 o 4 ramificazioni, che terminano con una molecola di acido sialico carica negativamente.²¹

Nel siero di persone sane meno del 1,5% della transferrina è legata a 7 molecole di acido sialico (eptasialo-Tf), 1,3% a 6 molecole di acido sialico (esasialo-Tf), 12-18% a 5 molecole (pentasialo-Tf), 64-80% a 4 molecole (tetrasialo-Tf), 4-9% a 3 molecole (trisialo-Tf), meno del 2,5% a due molecole (disialo-Tf).^{19,20}

La asialo-Tf e la monosialo-Tf non sono normalmente identificabili nel siero umano. In presenza di abuso alcolico la asialo-Tf diventa identificabile e quantificabile.

L'incremento della concentrazione sierica delle glicoforme meno glicosilate della transferrina a seguito di abuso cronico o ripetuto di alcol fu dimostrato per la prima volta nel 1978 da Helena Stibler che stava conducendo una ricerca sulle proteine del liquor cefalorachidiano di soggetti alcolisti cronici. Da allora sono stati condotti moltissimi studi sugli aspetti pre-analitici, analitici ed interpretativi della CDT, che costituiscono una solida base per l'uso di questo marcatore nella diagnosi di abuso alcolico cronico. Nello specifico, la ricerca scientifica ha chiarito che la CDT comprende la disialo-Tf e la asialo-Tf, essendo stata esclusa negli ultimi anni la monosialo-Tf, che inizialmente era compresa nella definizione. La disialo-Tf è quantificabile sempre nel siero umano con valori che si attestano, nel soggetto non abusatore intorno a 1,5% della transferrina totale. La asialo-Tf con le tecniche attualmente disponibili, è misurabile solo nel soggetto abusatore di alcol che presenti valori di disialo-Tf intorno al 3%. È assodato che i livelli serici delle isoforme di transferrina povere di acido sialico aumentano a seguito di una quotidiana assunzione di almeno 50-80 grammi di etanolo per un periodo non inferiore ad una settimana. I livelli di queste isoforme tornano nella norma dopo un periodo di astinenza di circa 2 settimane essendo caratterizzate da un'emivita di circa 14 giorni.²²

La sensibilità diagnostica della CDT si attesta tra il 60-80%, mentre la specificità diagnostica è prossima al 100%, considerando che le uniche condizioni che determinano

un aumento della CDT diverse dall'abuso alcolico sono la gravidanza fisiologica (condizione facilmente identificabile) e un insieme di patologie congenite note come CDG (congenital disorder of glycosilation) caratterizzate da un deficit di glicosilazione di diverse proteine tra cui la transferrina (condizione anche questa usualmente diagnosticata nei primi anni di vita e quindi non confondente rispetto ad una diagnosi di abuso alcolico).

La CDT trova diverse applicazioni sia in ambito clinico che amministrativo-giudiziario, risultando in Italia l'applicazione di maggiore rilevanza quella nell'ambito delle procedure per la verifica dell'idoneità della patente di guida a seguito del ritiro di questa per guida in stato di ebbrezza.

Dal punto di vista analitico, l'approccio inizialmente utilizzato per la determinazione della CDT era rappresentato dalla focalizzazione isoelettrica (IEF) con rivelazione immunometrica. Tuttavia questa tecnica, seppur altamente selettiva, presenta un importante limite rappresentato dall'inaccuratezza ed imprecisione della valutazione quantitativa basata sulla densitometria. Per questa ragione è stata progressivamente sostituita da altre tecniche quali metodi immunometrici, HPLC ed elettroforesi capillare.²³

Tradizionalmente la CDT era misurata mediante kits immunometrici commerciali basati sulla separazione in microcolonna a scambio ionico delle isoforme della transferrina seguita da rivelazione immunologica (RIA, ELISA, TIA etc.); tuttavia, in riferimento alle determinazioni immunologiche, nelle fasi pre-analitiche di separazione, talvolta la risoluzione era incompleta con una parziale coeluizione di frazione della transferrina "non CDT". Con queste metodiche, inoltre, la presenza di una variante genetica della proteina poteva dare adito ad un errore interpretativo. A metà degli anni 2000 è stato introdotto un approccio diretto, noto commercialmente come N Latex CDT. Questo si

basa su un dosaggio immunologico nefelometrico che impiega un anticorpo altamente specifico per le isoforme della transferrina CDT correlate.

L'elettroforesi capillare è stata proposta per la prima volta per l'analisi della CDT da Tagliaro et al. nel 1998.²⁴ Il metodo era basato su una separazione in elettroforesi capillare zonale mediante l'utilizzo di capillari in silice fusa (20 mm ID, 37 cm in lunghezza) e di un tampone composto da 100 mM di sodio tetraborato portato a pH 8.3. La rivelazione diretta della CDT era ottenuta mediante misurazione dell'assorbimento UV a 200 nm. Successivamente è stata pubblicata una versione ottimizzata dello stesso metodo da Crivellente et al.²⁵ Gli autori, mediante l'aggiunta di diaminobutano (DAB) al tampone di separazione, riducevano l'adsorbimento delle proteine sulla parte del capillare, ottenendo un netto miglioramento della sensibilità e specificità analitica.

Nel 2001 Wuits et al. hanno pubblicato un metodo che utilizzava reagenti commerciali, tra cui un policatione ed un polianione che, aggiunti al tampone, permettevano di ottenere un doppio coating del capillare (CEofix® CDT buffer system, Analis, Namur, Belgium). Tale sistema è stato modificato e migliorato negli anni successivi fino all'ultima versione del 2003 che fornisce buoni risultati non solo in termini di sensibilità analitica e riproducibilità, ma anche di risoluzione tra le isoforme. Nella pratica routinaria di laboratorio un rilevante miglioramento analitico è stato rappresentato dall'introduzione nel 2005-2006 di un elettroferografo multicapillare (Capillarys, Sebia, Issy-les-Moulineaux, France), dotato di 8 capillari, che permette di ottenere 7 analisi della CDT simultanee. Lo stesso produttore fornisce i reagenti per l'analisi di composizione brevettata.

Il primo metodo per l'analisi della CDT mediante HPLC è stato pubblicato da Jeppsson et al.²⁶ Il metodo era basato sull'uso dell'HPLC di scambio ionico, con colonna Mono Q e rivelazione UV a 460 nm del complesso Fe-Tf. Dopo il primo lavoro di Jeppsson, altri

autori hanno utilizzato questa tecnica introducendo minime modifiche al metodo originale.²⁷ In generale tutti i metodi pubblicati prevedono una fase di pretrattamento del campione comprensiva di saturazione ferrica e precipitazione delle lipoproteine, una fase di analisi in HPLC con colonna a scambio anionico utilizzando un gradiente composto da una fase A composta solitamente da tampone bis-tris, una fase B in cui al tampone bis-tris è aggiunto cloruro di sodio ed una fase C di lavaggio contenente cloruro di sodio ad elevata concentrazione, ed infine una fase di rivelazione per assorbimento UV-Vis a 460 nm specifico per il ferro. Sebbene l'analisi in HPLC sia piuttosto lunga e relativamente costosa, essa rimane la tecnica di riferimento per la determinazione della CDT, essendo ad oggi comunque la tecnica più selettiva. Recentemente sono inoltre divenuti disponibili kit commerciali per l'analisi della CDT in HPLC che forniscono i reattivi per il trattamento del campione, le fasi mobili e la colonna a scambio anionico.

Gamma-Glutamil Transferasi (GGT)

È un enzima glicoproteico di membrana localizzato nel fegato sul lato sinusoidale degli epatociti ed in molti altri organi quali rene, pancreas, ghiandole mammarie, intestino, polmone, milza, tiroide, midollo osseo. Il suo ruolo primario è metabolizzare il glutatione (GSH) ridotto extracellulare e consentire ai precursori degli amminoacidi di essere assimilabili ed utilizzabili per la sintesi di GSH intracellulare, catalizzando il trasporto del gruppo glutammile da un glutamil-peptide ad un altro peptide o amminoacido. Contrariamente a quanto avviene per la fosfatasi alcalina, l'aumento dell'attività di questo enzima è legato soprattutto al fegato piuttosto che ad altri organi o tessuti, mostrando aumenti in tutte le forme di patologia epatica¹⁷, specialmente di origine alcolica. È attualmente il test di primo livello più utilizzato nella diagnosi di

abuso cronico, dove aumenta per induzione enzimatica connessa con la formazione di specie reattive dell'ossigeno e nei bevitori che assumono alcol dopo un periodo di astinenza. Non aumenta invece a seguito di assunzioni acute di alcol, richiedendo probabilmente un consumo eccessivo ripetuto maggiore di 60 g/die per un periodo di più settimane. La sua emivita è compresa tra 14 e 26 giorni ed i suoi livelli ematici si regolarizzano dopo circa 3-4 settimane di astensione¹⁷ o più se sussiste danno epatico; pertanto riveste un importante ruolo come marcatore di astinenza. È uno dei marcatori più sensibili (sensibilità 34-85%, maggiore negli uomini), ma ha bassa specificità (11-85%)²⁸, con riscontro di falsi positivi in epatopatie non alcoliche, pancreatite, diabete, obesità, iperlipidemia, disturbi cardiovascolari, infarto, ipertensione, gravi traumi, assunzione di farmaci come barbiturici, antiepilettici, anticoagulanti, responsabili di un'azione enzimo-inducente, patologie renali, stasi biliare, tumori al fegato.

Uso combinato di GGT e CDT

Molti studi negli ultimi 15 anni hanno suggerito che l'uso combinato dei 2 markers CDT e GGT attraverso una formula matematica sia in grado di identificare una più alta percentuale di soggetti abusatori di alcol rispetto all'utilizzo di tali indicatori singolarmente. Il marcatore combinato GGT-CDT (chiamato anche γ -CDT), pare aumentare a seguito di un consumo quotidiano di alcol di oltre 40 g/die e rientrerebbe nella norma dopo 2-3 settimane di totale astinenza, con una sensibilità diagnostica maggiore delle sue singole componenti.²⁹

Volume corpuscolare medio (MCV)

In presenza di consumo cronico di alcol l'MCV aumenta poichè l'etanolo ha un ruolo tossico diretto sulla membrana eritrocitaria ed esercita interferenza sull'assorbimento intestinale di acido folico e vitamina B12. L'incremento secondariamente è legato

all'azione dell'acetaldeide sulla replicazione dei precursori degli eritrociti a livello midollare. Usualmente l'incremento dell'MCV si verifica dopo 4-8 settimane di abuso e la sua normalizzazione richiede circa 3 mesi poichè è correlato alla vita media dei globuli rossi. La sua sensibilità compresa fra il 34 e l'89% è maggiore nelle donne e la sua specificità è del 25-91% (falsi positivi in carenza di folati o vitamina B12, malattie ematologiche, patologie epatiche non alcol correlate, tabagismo, patologie tiroidee, emorragie, uso di antiepilettici)¹⁷. Si rivela essere un utile marcatore per individuare gli alcolisti, ma a causa della sua bassa sensibilità deve sempre essere associato ad altri indici.

Aspartato aminotransferasi (AST o SGOT) e Alanina aminotransferasi (ALT o SGPT)

Le transaminasi epatiche sono costituite da enzimi che catalizzano il trasporto di un gruppo amminico da un aminoacido ad un chetoacido. Sono presenti in numerosi tessuti, particolarmente nel cuore, cervello, fegato.

Le concentrazioni sieriche sono elevate nei forti bevitori, anche se sono parametri più indicati per constatare un danno epatico piuttosto che un consumo di bevande alcoliche in quanto il loro aumento infatti è legato alla rottura della membrana cellulare. Il rapporto AST/ALT superiore a 2 è stato suggerito essere indicativo di un'eziologia alcolica dell'epatopatia. L'emivita si aggira intorno alle 2-3 settimane dopo la completa astensione dall'alcol, in assenza di danno epatico permanente. Essendo parametri aspecifici, si possono avere falsi positivi in caso di epatopatia non alcolica (AST e ALT), disordini muscolari (AST) e infarto miocardico (AST); pertanto la loro utilità è considerata insufficiente nel contesto amministrativo-forense.¹⁷

In conclusione esistono numerosi strumenti per la diagnosi ed il follow-up nell'intossicazione da alcol ma il loro utilizzo dev'essere mirato allo scopo da

raggiungere. Per la rilevazione di abuso in condizione di pericolo per l'incolumità delle persone, come la guida in stato di ebbrezza, o la valutazione di condizioni di alcol dipendenza in attività lavorative rischiose per terzi, i markers ottimali sono l'etanolo in aria espirata per la verifica di assunzione acuta e CDT, EtG in matrice pilifera e GGT, per l'analisi di situazioni di consumo problematico.

4. Studio sperimentale

4.1 Introduzione e scopo

Come già accennato nell'introduzione al presente lavoro, gli state markers biochimici di abuso alcolico, specificamente la CDT e la GGT, oltre che nella diagnosi di condizioni di abuso alcolico cronico o ripetuto di alcol, vengono utilizzati in maniera efficace per identificare il rischio di agire sotto l'effetto di alcol nel corso di attività rischiose per la salute di terzi come la conduzione di veicoli.³⁰ L'uso di tali marcatori nella valutazione dell'idoneità alla patente di guida è appunto inteso ad identificare i soggetti a rischio di essere coinvolti in incidenti stradali alcol-correlati. Questo tipo di approccio preventivo non risulta sia mai stato applicato nel contesto della sicurezza sul lavoro neppure nel caso di soggetti il cui lavoro consiste nella conduzione dei veicoli.

Da queste premesse è nata l'idea di un progetto di ricerca atto a verificare in una popolazione di autisti di autobus la possibilità di utilizzare la CDT e la GGT come predittori di rischio di incidente alcol-correlato. Il progetto di ricerca consiste in uno studio longitudinale della lunghezza di 5 anni (2014-2018) che coinvolge 600 autisti di autobus dell'Azienda di Trasporto Pubblico (ATV) di Verona.

Tale progetto ha visto una prima fase piuttosto complessa in cui il medico competente di ATV ha incontrato i dirigenti ed i rappresentanti sindacali illustrando le premesse e gli obiettivi del progetto al fine di ottenere una loro fattiva collaborazione all'implementazione del medesimo. La proposta di ricerca ha incontrato inizialmente molte resistenze data la necessità di procedere ad un prelievo di sangue, considerato un prelievo invasivo. Al fine di superare tali resistenze si è provveduto allo sviluppo di una metodica analitica idonea all'analisi della CDT su Dried Blood Spot, da proporre come alternativa ai lavoratori che rifiutavano il prelievo venoso. Tale proposta ha incontrato il

favore dei dirigenti e dei rappresentanti sindacali e nel febbraio 2014 è partito lo studio. L'obiettivo dello studio era duplice. Il primo aspetto che si voleva indagare era la prevalenza di soggetti abusatori di alcol tra gli autisti di autobus, sia per comprendere la reale portata del fenomeno, sia per intraprendere adeguate misure nei confronti delle persone così identificate. Il secondo aspetto riguardava la correlazione dei dati di CDT e GGT con il rischio di provocare o subire incidenti stradali nel corso dell'attività di conduzione di autobus.

Il progetto di ricerca è tuttora in corso e terminerà nel 2018. Il presente lavoro di tesi, parte integrante del progetto di ricerca, si è focalizzato sullo sviluppo del metodo analitico alternativo per la determinazione della CDT basato sull'utilizzo dei Dried Blood Spot, nonché su una valutazione statistico-epidemiologica dei risultati dei primi tre anni di studio (2014-2016).

4.2 Materiali e metodi

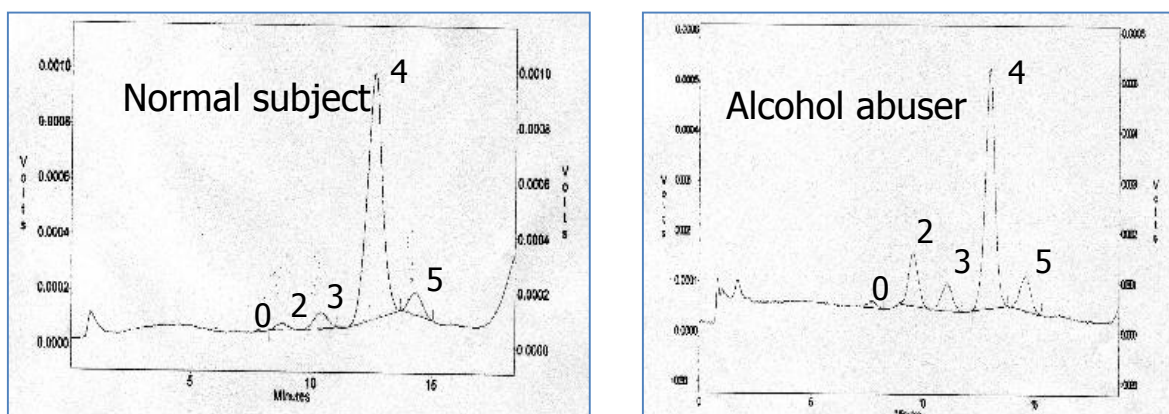
Lo studio ha riguardato 600 dipendenti di ATV specificamente deputati alla guida dell'autobus. Il prelievo di sangue era eseguito dal medico competente previo ottenimento del consenso dell'interessato in occasione dell'annuale visita di sorveglianza sanitaria. In caso di rifiuto a sottoporsi a prelievo venoso si procedeva all'esecuzione del Finger prick Dried Blood Spot come descritto nel dettaglio nella sezione successiva.

Al termine della sessione di prelievi, i campioni di sangue e i cartoncini con il dried blood spot erano trasportati presso il laboratorio di tossicologia forense del Dip. di Diagnostica e Sanità Pubblica dove i campioni di sangue erano centrifugati al fine di ottenere il siero che veniva poi conservato a + 4°C fino all'analisi, che veniva eseguita entro 48 ore. I Dried Blood Spot erano processati immediatamente dopo la consegna.

L'analisi CDT era eseguita con un metodo HPLC validato utilizzando un cromatografo a gradiente ad elevate prestazioni dotato di un detector UV-visibile settato a 460 nm (Shimadzu, Tokyo, Japan). La separazione della glicoforme era effettuata utilizzando una colonna a scambio anionico di 4,6X65 mm (Recipe, Monaco, Germany) applicando una eluizione a gradiente di sale (tampone A: 10 mM BIS-TRIS pH 6.2; tampone B: 10 mM BisTris+500 mM; tampone C: 2 M NaCl). La preparazione del campione prevedeva l'aggiunta ad 1 millilitro di siero di 18 microlitri di FeCl_3 10 mM e 25 microlitri di NaHCO_3 500 mM al fine di ottenere la saturazione ferrica, nonché l'aggiunta di 10 microlitri di destrano solfato 100 milligrammi/mL e di 50 microlitri di CaCl_2 1 M per la precipitazione delle lipoproteine.

La figura 2 mostra i tipici cromatogrammi ottenuti da un soggetto non abusatore e da un soggetto abusatore di alcol.

Figura 2 - Tipico cromatogramma di un soggetto normale e di un soggetto abusatore di alcol rispettivamente (0: asialo-Tf, 2: disialo-Tf, 3: trisialo-Tf, 4: tetrasialo-Tf, 5: pentasialo-Tf).



La CDT (disialo-Tf+asialo-Tf, se misurabile) era espressa come percentuale del contenuto totale di transferrina (comprendendo tutte le glicoforme misurabili dalla asialo-transferrina alla pentasialo transferrina). Sulla base di un solido corpo di

letteratura e dell'esperienza del laboratorio il limite tra soggetti normali ed abusatori era fissato a 1,90%.³¹

L'analisi della GGT era eseguita mediante un immunoassay commerciale (Beckman Coulter) su un analizzatore automatico (Olympus AU400, Melville, NY, USA), secondo le istruzioni del produttore.

Il valore soglia della GGT era fissato a 50 U/L per i maschi e 38 U/L per le femmine.

4.3 Analisi CZE-UV e HPLC-FI dei Finger Prick Dried Blood Spot (fpDBS)

La metodica denominata Finger Prick Dried Blood Spot (fpDBS) consiste nell'analisi di sangue capillare depositato su idoneo supporto a seguito di piccola puntura digitale (Finger Prick). Tale metodica, nata come alternativa dell'analisi del campione di sangue venoso in quanto meno invasiva, eseguibile anche da non professionisti sanitari, meglio accettata dai pazienti, nonché caratterizzata da minor rischio di contaminazione infettiva per lo staff (HBV, HCV, HIV), ha visto negli anni una rapida diffusione nell'ambito dello screening di malattie neonatali, analisi di farmaci, di droghe d'abuso e di contaminanti ambientali. Inoltre l'uso dei fpDBS è stato proposto per monitorare il consumo di alcol mediante il dosaggio del fosfatidiletanolo, dell'etilglucuronide e dell'etilsolfato.^{32,33}

Non risulta invece in letteratura siano stati pubblicati metodi per l'analisi della CDT mediante fpDBS fino al lavoro recentemente pubblicato dal gruppo di lavoro del prof. Tagliaro³⁴, la collaborazione con il quale ha portato alla redazione del presente lavoro sperimentale.

Preliminarmente allo sviluppo della metodica per l'analisi della CDT mediante fpDBS è stato fatto uno studio per identificare la migliore carta assorbente. L'indagine è stata rivolta alla comune carta da filtro e quindi a 2 carte specificatamente assorbenti

(Ahlstrom filter paper e Whatman filter paper), che si sono rivelate più idonee della semplice carta da filtro sia in termini di rapidità di assorbimento che di volume di assorbimento.

Relativamente al trattamento del DBS, la difficoltà maggiore è stata rappresentata dal fatto che l'analisi del sangue capillare consiste in un'analisi di sangue intero e non di siero come avviene normalmente nell'analisi della CDT. L'aspetto maggiormente critico dell'analisi di sangue intero è rappresentato dall'interferenza dell'emoglobina, che oltre ad essere presente ad elevate concentrazioni nel sangue intero presenta un punto isolettrico e un peso molecolare molto simile alla transferrina ($pI\ Hb = 7 / pI\ Tf = 5.7$; $PM\ Hb = 64.5\ KDa / PM\ Tf = 80\ KDa$).

Tali problematiche sono state superate mediante un complesso trattamento del campione, di seguito descritto nel dettaglio.

Dopo la raccolta dei DBS mediante puntura del polpastrello del quinto dito della mano con una lancetta (Microlet R Bayer, Leverkusen, Germany), e successiva deposizione delle gocce di sangue capillare all'interno di cerchi premarcati (diametro: 13 mm; capacità: 60 ± 5 microL) disegnati su cartoncini di carta da filtro Expertmed (Verona, Italy), ciascun cartoncino era lasciato a seccare a temperatura ambiente per circa 2 ore.

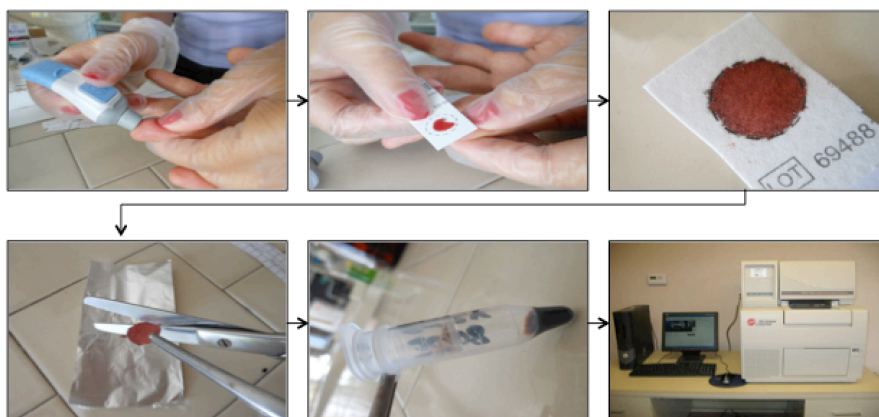
Successivamente era conservato a temperatura ambiente fino all'estrazione e all'analisi che avvenivano entro 1-6 ore.

Ai fini dell'estrazione si procedeva a tagliare con una forbice il disco imbibito di sangue in tanti piccoli pezzi trasferendo gli stessi dentro un tubo con filtro di estrazione (0.22 microm) aggiungendo successivamente 60 microL di HCl 120 mmol/L. Inizialmente l'estratto della digestione del DBS era ripreso in acqua. Ciò tuttavia comportava una rilevante interferenza dell'emoglobina al momento dell'analisi in elettroforesi capillare. Considerando che a $pH < 4$ l'emoglobina diventa dimero o monomero cambiando sia il

pI che il PM si è quindi proceduto a delle prove con diversi acidi e a diverse concentrazioni al fine di abbassare efficacemente il pH e quindi aumentare la differenza di mobilità elettroforetica tra emoglobina e transferrina. All'esito dell'ottimizzazione del metodo il pH della soluzione filtrata era portato a 3,5 con HCl 120 mmol/L. Dopo 1 h di incubazione a temperatura ambiente o overnight a +4°C il pH di ciascuna soluzione era riaggiustato a 7,5 (al fine di essere certi che i residui di acido sialico presentassero carica negativa) mediante l'aggiunta di 30–40 microL di sodio tetraborato. Dopo un'ulteriore incubazione di 1 h a temperatura ambiente o overnight a +4°C il campione era centrifugato (15 min a $1500 \times g$) e il supernatante saturato con una soluzione ferrica (1:2). Dopo 1 ora il campione era analizzato mediante elettroforesi capillare zonale (CZE) mediante elettroferografo capillare P/ACE MDQ CE (Beckman Coulter Instruments, CA, USA).

La separazione delle glicoforme della transferrina mediante CZE avveniva ad un voltaggio costante di 30 kV e temperatura di 25°C utilizzando un tampone borato a pH 8 aggiunto di DAB (concentrazione finale: 7,5 mmol/L). La rivelazione era basata sull'assorbimento UV a 200 nm.

Figura 3 - rappresentazione grafica dell'analisi fpDBS della CDT.

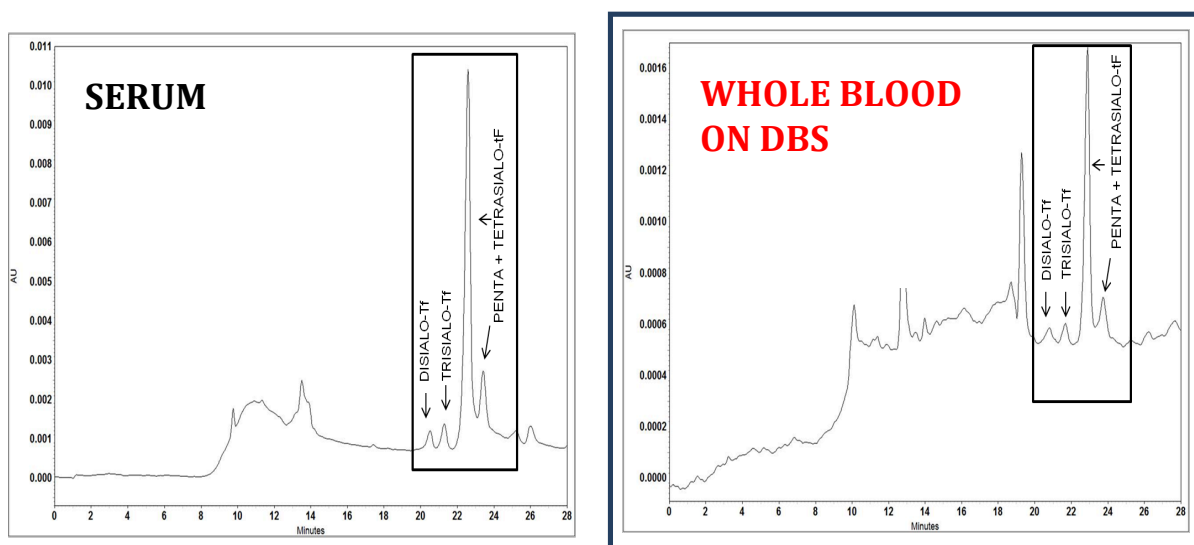


La metodica ottimizzata ha permesso di ottenere una buona separazione delle glicoforme della transferrina comparabile con quella che si ottiene analizzando il siero.

La figura 4 sottostante mostra gli elettroferogrammi ottenuti dall'analisi del siero (sinistra) e dall'analisi del sangue intero estratto dai DBS (destra) dello stesso soggetto.

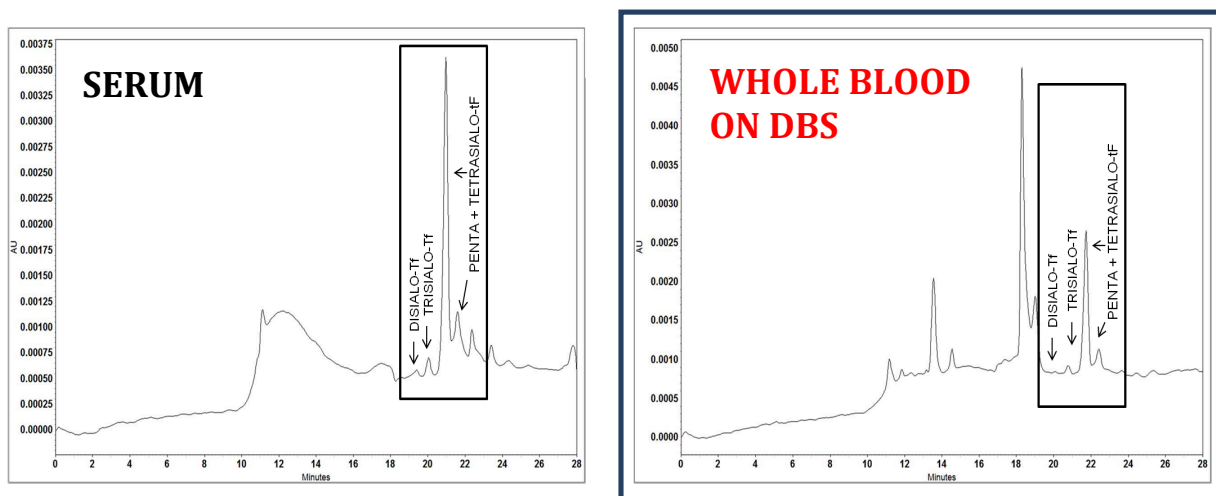
In questo caso il valore di CDT risulta essere elevato ($> 1.8\%$).

Figura 4 – Elettroferogrammi ottenuti dall'analisi del siero (sinistra) e dall'analisi del sangue intero estratto dai DBS (destra) dello stesso soggetto.



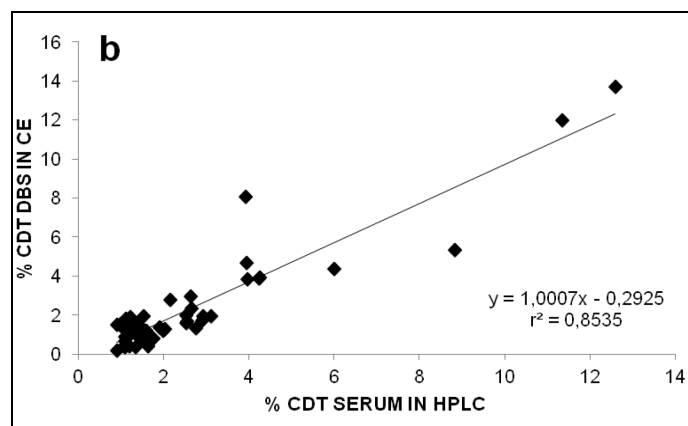
La figura 5 mostra gli elettroferogrammi ottenuti dall'analisi del siero (sinistra) e dall'analisi del sangue intero estratto dai DBS (destra) dello stesso soggetto. In questo caso il valore di CDT risulta essere nel range di normalità ($< 1.8\%$).

Figura 5 - Elettroferogrammi ottenuti dall'analisi del siero (sinistra) e dall'analisi del sangue intero estratto dai DBS (destra) dello stesso soggetto.



Al fine di verificare l'affidabilità analitica della nuova metodica era eseguito uno studio comparativo mettendo a confronto i risultati dell'analisi della CDT su prelievo venoso e quelli dell'analisi della CDT su fpDBS ottenuti da 47 soggetti su ciascuno dei quali erano eseguiti entrambi i tipi di prelievo. Il confronto dei dati ha evidenziato una correlazione statisticamente altamente significativa come illustrato nel grafico 4. Il confronto dei dati permetteva di identificare il cut off della CDT mediante analisi fpDBS a 1,7%. Utilizzando tale cut off la specificità dell'analisi, utilizzando come riferimento il metodo in HPLC, era pari a 83% e la sensibilità era pari a 79%.

Grafico 4 - Correlazione tra i risultati ottenuti mediante analisi della CDT su prelievo venoso e quelli della CDT su fpDBS.



Come sarà illustrato nel dettaglio nella sezione successiva, la possibilità di eseguire fpDBS al posto del prelievo venoso ha permesso di sottoporre tutti i soggetti inclusi nello studio ad analisi della CDT.

Tuttavia, l'analisi fpDBS-CZE, trattandosi anche di un'analisi di recente implementazione, è stata trattata come indagine di screening, per cui nei primi due anni dello studio (2014-2015) i soggetti che presentavano valori elevati o borderline di disialo-Tf ($>1,5\%$) erano invitati a ripresentarsi per eseguire il prelievo venoso. Problematiche di natura organizzative hanno tuttavia impedito l'applicazione in tutti i casi di questo protocollo, per cui per una parte dei soggetti non è stato disponibile un valore definitivo di CDT.

Su questa base, nella seconda metà del terzo anno di studio è stato proposto, nel caso in cui il soggetto scegliesse il fpDBS, di raccogliere due DBS, anziché uno. Il primo da analizzarsi mediante CZE e il secondo da analizzarsi, solo in caso di valore borderline o positivo del primo, mediante HPLC-Fl.

Il metodo HPLC-Fl, recentemente pubblicato dallo stesso gruppo di ricerca menzionato in precedenza, è basato sulla rivelazione in fluorescenza (lunghezza d'onda in

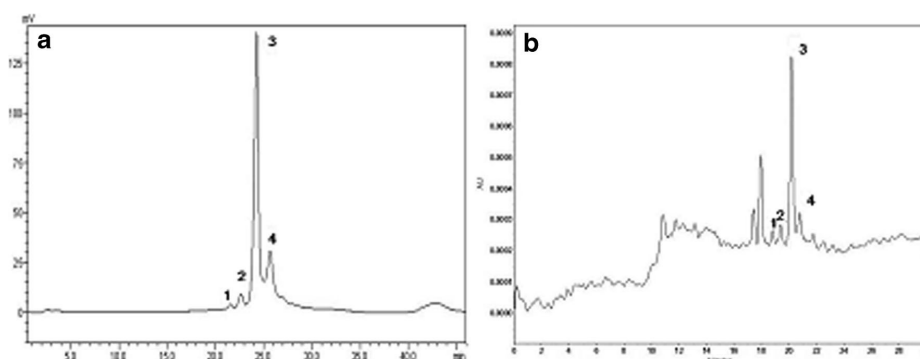
eccitazione a 298 nm; lunghezza d'onda di emissione a 550 nm) delle glicoforme della transferrina rese fluorescenti dall'aggiunta del terbio.³⁵

Dato che vengono rivelati selettivamente solo gli addotti Tb-Tf, la metodica si è mostrata estremamente specifica e per questo applicabile anche a matrici diverse dal siero per la determinazione della CDT, quali il liquor cefalo-rachidiano, il sangue cadaverico e gli estratti dei DBS.

Relativamente a questi ultimi è stata sviluppata una metodica semplificata di trattamento del DBS che prevede l'aggiunta al cerchietto di carta del DBS, non più tagliato, ma solo ripiegato in 4, di 60 microL di acido gluconico (200 mM). Dopo 1 ora di incubazione a temperatura ambiente, il campione viene filtrato e quindi aggiunto di 5 microL di una soluzione di cloruro di terbio. La soluzione risultante viene centrifugata e il surnatante iniettato in HPLC.

La figura 6 mostra i profili HPLC-Fl (a sinistra) e CZE-UV (a destra) ottenuti dall'analisi del DBS. E' evidente come il cromatogramma HPLC-Fl sia molto più pulito non essendo presente alcun picco interferente.

Figura 6 - Profili HPLC-Fl (a sinistra) e CZE-UV (a destra) ottenuti dall'analisi del DBS.



4.4 Risultati e Discussione

Nel corso del triennio 2014-2016 è stato eseguito uno studio longitudinale su circa 600 soggetti dipendenti ATV sui quali era eseguito un prelievo all'anno. A causa di iniziali difficoltà di natura organizzativo-amministrativa il numero di soggetti esaminati per anno è risultato in aumento nel corso dei 3 anni a causa del progressivo arruolamento di nuovi soggetti (2014: 501 soggetti; 2015: 629 soggetti; 2016: 697 soggetti).

La valutazione dei risultati su base annua è riportata di seguito.

- Nel **2014** sono stati esaminati 501 soggetti: di questi, 381 (377 maschi e 4 femmine, di età compresa tra 22-66 anni;) sono stati sottoposti a prelievo venoso per la determinazione di CDT e GGT; i restanti 120 sono stati sottoposti a fpDBS.

Per i 381 soggetti di cui erano disponibili i dati di CDT e GGT, la media (\pm SD) di GGT e CDT era 34.21 U/L (\pm 24.39) e 1.17% (\pm 0.38), rispettivamente.

Di questi, 9 (2,4%) avevano un valore di CDT $>$ 1.90% (range 2.14-4.75, media 2.95).

Secondo il protocollo, gli stessi soggetti ripetevano il test dopo tre settimane durante le quali era loro chiesto di interrompere l'assunzione di alcol. Al secondo controllo, 7 dei 9 soggetti mostravano valori di CDT nel range di normalità, mentre 2 soggetti mostravano ancora valori elevati di CDT, anche se inferiore rispetto al precedente.

Sessantadue soggetti (16%) avevano un valore di GGT più alto del limite normale (range 50.02-208.71, media 77.70).

I soggetti sottoposti a prelievo venoso (N=381) erano suddivisi in 2 gruppi (\leq 45 anni e $>$ 45 anni). Nel primo gruppo (N=150) la percentuale dei CDT positivi era risultata pari 6% (9 positivi su 150), mentre nel secondo gruppo (N=231) la percentuale dei positivi era risultata pari a 2,2% (5 positivi su 231).

Dall'analisi statistica effettuata con il test del chi-quadrato risulta che la differenza tra le percentuali dei 2 gruppi non è statisticamente significativa e quindi è dovuta al caso.

Relativamente alla GGT la percentuale dei positivi nel primo gruppo risultava pari a 10% (15 positivi su 150); mentre nel secondo gruppo 20,3% (47 positivi su 231).

Dall'analisi statistica effettuata con il test del chi-quadrato risulta che la differenza tra le percentuali dei 2 gruppi è statisticamente significativa.

Nel **2015** sono stati esaminati 629 soggetti. Di questi, 428 soggetti (425 maschi e 3 femmine di età compresa tra i 23-61 anni) sono stati sottoposti ad analisi per la determinazione della CDT e GGT; i restanti 201 sono stati sottoposti ad analisi mediante fpDBS.

La media (\pm SD) di GGT, e CDT era 32.77 U/L (\pm 25.63) e 1.12% (\pm 0.33), rispettivamente.

Dei 428 soggetti, 9 (2,1%) avevano un valore di CDT $> 1.90\%$ (range 1.93-2.63, media 2.13) e 66 (15%) avevano un valore di GGT più alto del limite normale (range 50.49-252.74, media 82.19).

I soggetti sottoposti a prelievo venoso (N=428) erano suddivisi in 2 gruppi (≤ 45 anni e > 45 anni). Nel primo gruppo (N=173) la percentuale dei CDT positivi era risultata pari 2,9% (5 positivi su 173), mentre nel secondo gruppo (N=255) la percentuale dei positivi era risultata pari a 1,6% (4 positivi su 255).

Dall'analisi statistica effettuata con il test del chi-quadrato risulta che la differenza tra le percentuali dei 2 gruppi non è statisticamente significativa e quindi è casuale.

Relativamente alla GGT la percentuale dei positivi nel primo gruppo risultava pari a 11,6% (20 positivi su 173); mentre nel secondo gruppo 18% (46 positivi su 255).

Dall'analisi statistica effettuata con il test del chi-quadrato risulta che la differenza tra le percentuali dei 2 gruppi non è statisticamente significativa e quindi è dovuta al caso.

- Nel **2016** sono stati analizzati 697 soggetti: di questi, 505 soggetti (501 maschi e 4 femmine di età compresa tra i 24-65 anni;) sono stati sottoposti ad analisi per la determinazione della CDT e GGT; i restanti 192 sono stati sottoposti ad analisi mediante spot. La media (\pm SD) di GGT, e CDT era 33.35 U/L (\pm 28.50 e 1.11% (\pm 0.45), rispettivamente.

Dei 505 soggetti, 10 (1,98%) avevano un valore di CDT $> 1.90\%$ (range 1.93-7.79, media 2.92) e 76 (15%) avevano un valore di GGT più alto del limite normale (range 50.31-333.74, media 82.74).

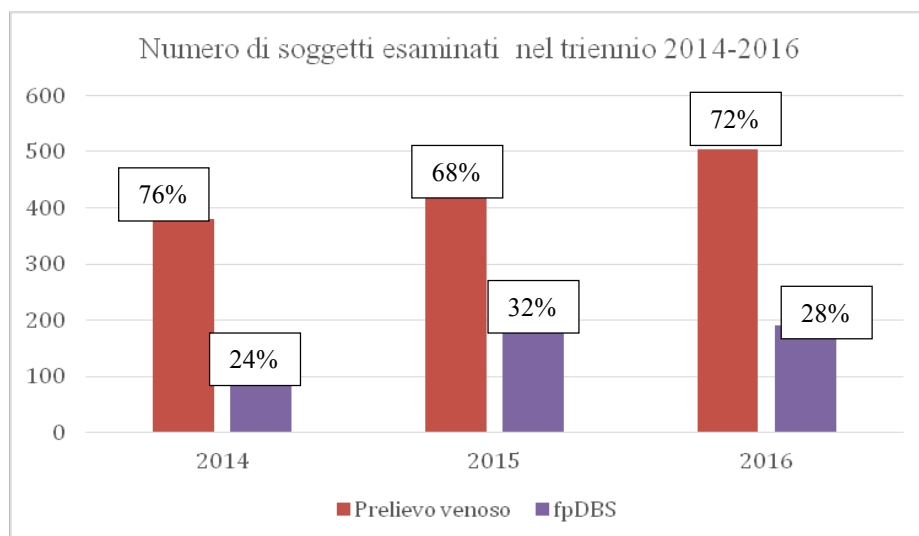
I soggetti sottoposti a prelievo venoso (N=505) erano suddivisi in 2 gruppi (≤ 45 anni e > 45 anni). Nel primo gruppo (N=220) la percentuale dei CDT positivi era risultata pari a 1,8% (4 positivi su 220), mentre nel secondo gruppo (N=285) la percentuale dei positivi era risultata pari a 2,1% (6 positivi su 285).

Dall'analisi statistica effettuata con il test del chi-quadrato risulta che la differenza tra le percentuali dei 2 gruppi non è statisticamente significativa.

Relativamente alla GGT la percentuale dei positivi nel primo gruppo risultava pari a 13,2% (29 positivi su 220); mentre nel secondo gruppo 16,5% (47 positivi su 285).

Dall'analisi statistica effettuata con il test del chi-quadrato risulta che la differenza tra le percentuali dei 2 gruppi non è statisticamente significativa e quindi è dovuta al caso.

I dati sopra descritti sono riassunti nel grafico 5 sotto riportato.



Nel corso del triennio si evidenzia un progressivo aumento dei soggetti coinvolti nello studio (da 501 a 697). Tale incremento è sostanzialmente da imputarsi ad un miglioramento dell'efficienza organizzativa con possibilità di reclutare un maggior numero di lavoratori senza danneggiare il servizio. La percentuale di soggetti che hanno scelto di sottoporsi al fpDBS risulta significativa in tutto il triennio variando da 1/4 a 1/3 di tutti i soggetti, dimostrando l'utilità di tale strategia analitica nel mantenere elevato il numero di soggetti reclutati.

La percentuale di soggetti positivi al test della GGT e al test della CDT risulta sostanzialmente stabile nel triennio come illustrato dalla tabella 3.

	% positivi GGT	% positivi CDT
2014	16%	2,4%
2015	15%	2,1%
2016	15%	2,0%

La percentuale di soggetti positivi è relativamente bassa, ma comunque significativa, dato che tali soggetti a rischio di abuso alcolico e quindi di guida sotto

l'effetto di alcol non sarebbero stati identificati dal medico competente se non fosse stato eseguito questo test.

Il fatto che la percentuale di soggetti positivi al test del GGT sia nettamente più elevato di quelli positivi al test della CDT potrebbe trovare almeno due spiegazioni. In primo luogo si deve ricordare come la GGT si innalzi non solo come conseguenza di abuso alcolico ma anche di altre condizioni come epatopatie, ipertensione, etc. Secondariamente, la GGT si caratterizza per una finestra cronologica più ampia di quella delle CDT (fino a 1 mese), per cui a seguito di astinenza si avrà prima la negativizzazione della CDT e poi quella della GGT.

La tabella 4 riassume i dati dei soggetti risultati positivi alla CDT o alle GGT almeno una volta nel corso del triennio che è pari a 21. Come si vede nella tabella la maggior parte dei soggetti presenta una o due positività nei tre anni. Un solo soggetto risulta positivo in tutti e tre gli anni.

N	Subject	Date of birth	Date of examination	GGT	% disialo
1	NF	31/05/1972	06/06/2014	26.75	3.82
			21/05/2015	28.03	2.01
			27/04/2016		2.20
			27/06/2016		1.45
2	MB	21/10/1958	04/06/2014	73.77	3.51
			23/07/2014		0,86
			21/05/2015	60.90	2.05
3	OC	31/12/1961	21/07/2014	69.55	2.60
			09/03/2015	23.24	2.63
			09/03/2016	24,21	1,11
4	DC	16/08/1975	17/07/2014	23.84	2.31
			27/08/2014	20.74	1.82
			18/02/2015	20.68	1.95
			04/07/2016		1.94
5	AD	04/03/1969	27/05/2014	45.21	2.14
			23/07/2014		2.45
			23/09/2015	38.72	2.09
			03/02/2016	41.38	1.85
6	RS	12/02/1956	17/04/2014	23.06	4.75
			27/04/2014		4,71
7	GA	26/01/1986	07/07/2014	15.41	2.69

			05/05/2015		fpDBS
			01/08/2016		FpDBS 1,34
8	MM	07/10/1970	16/06/2014	29.04	2.58
			27/08/2014		0,91
			11/02/2015		fpDBS
					FpDBS 0,84
9	OG	10/09/1974	02/11/2015	-	FpDBS 2.36
			12/10/2016		2,87
10	DT	04/08/1973			
			10/11/2016	14.37	4.91
11	DP	06/03/1964	13/11/2014	75.12	1.63
			22/06/2015	62.88	2.16
			28/09/2016	97.34	1.72
12	AF	24/07/1975	21/10/2015	-	FpDBS 1.99
			01/08/2016		8.11
13	WL	19/06/1971	23/06/2014		FpDBS
			31/03/2015	66.34	1.93
			11/04/2016		FpDBS
14	AM	04/07/1979	03/07/2014		FpDBS
			09/03/2015	68.94	1.27
			06/04/2016	76.19	2.02
			20/06/2016	48.66	1.77
15	NP	25/01/1964	27/08/2014	56.27	1.68
			21/05/2015	56.00	1.60
			17/03/2016	76.86	1.93
16	PV	24/11/1965	07/09/2015	56.59	1.36
			17/03/2016	70.98	1.94
17	RB	21/02/1963	14/05/2015	30.74	0.50
			27/06/2016		FpDBS 5.17
			05/10/2016	30.54	7.79
			07/11/2016		FpDBS 2.64
18	LG	27/11/1956	22/06/2015	44.09	0.24
			30/03/2016	35.26	3.15
			20/06/2016	44.74	1.99
19	VP	10/02/1968	01/09/2014	37.59	1.01
			15/07/2015	20.12	1.67
			01/07/2016	23.94	2.19
20	MS	06/11/1974			
			03/03/2016	19.69	2.23
			25/07/2016	14.06	1.36
21	GS	08/03/1970	24/11/2014	27.63	1.62
			26/10/2016	33.96	2.02

Tali risultati evidenziano innanzitutto la necessità di un monitoraggio longitudinale dei lavoratori, unico in grado di identificare situazioni a rischio. Ci sono infatti dei soggetti che risultati negativi ai controlli nei primi due anni dello studio, sono risultati positivi al

terzo. In altri casi, soggetti risultati positivi al primo controllo, ai successivi sono sempre risultati negativi evidenziando il potere deterrente di tale strategia preventiva. Infine lo studio ha permesso di identificare due situazioni molto gravi (AF e RB) con valori di CDT nettamente innalzati dando la possibilità al medico competente di adottare idonee misure terapeutiche e precauzionali.

4.5 Conclusioni

Il presente studio sperimentale, incluso in un progetto di ricerca quinquennale sulla correlazione tra abuso alcolico cronico e rischio di incidenti alcol-correlati, è stato focalizzato principalmente sull'implementazione di una strategia analitica basata sui fpDBS al fine di ridurre il numero di non adesioni allo studio giustificate dall'invasività del prelievo venoso. Tale approccio ha avuto successo come dimostrato dal progressivo aumento di persone reclutate nel corso dei primi tre anni di studio.

A quanto risulta questo è il primo studio, almeno in Italia, che indaga la prevalenza del fenomeno del consumo eccessivo cronico o ripetuto di alcol in una popolazione di lavoratori che svolge mansioni a rischio per la salute di terzi quali i conducenti di autobus. In questa popolazione, grazie allo studio, è stata identificata una sottopopolazione (almeno 2% dei soggetti reclutati) con abitudini alcoliche potenzialmente rischiose per la salute di terzi e quindi da sottoporsi ad attento monitoraggio.

5. Bibliografia

- ¹ Scafato E, Ghirini S, Galluzzo L, Gandin C, Martire S, Russo R: Alcol: i consumi a rischio e le tendenze del bere in Italia. Centro Collaboratore WHO per la Ricerca e la Promozione della Salute su Alcol e Problematiche Alcol-correlate-Osservatorio Nazionale Alcol. CNESPS. Istituto Superiore di Sanità (ISS), Roma 2007. In: www.iss.it
- ² Sanchez-Graig M., Wilkinson A. & Davila R. Empirically based guidelines for moderate drinking: 1-year results from three studies with problem drinkers. *Am J Public Health* 85:823-828, 1995
- ³ Werner M. Assessing moderate alcohol consumption as a personal risk factor. *Clin Chim Acta* 246:5-20, 1996
- ⁴ Sanchez-Craig M. & Israel Y. Pattern of alcohol use associated with self-identified problem drinking. *Am J Public Health* 75:178-180, 1985
- ⁵ Niemelä O. In: Sherman D., Preedy V. & Watson R. (eds) *Ethanol and the liver: Mechanism and management*. Harwood academic publishers, Perkschire, 1998
- ⁶ Walker PF. Epidemiology of Alcohol-Related Accidents and the Grand Rapids Study. *Forensic Sci Rev.* 2000 Jan;12(1-2):107-18. Review
- ⁷ Canfield DV, Dubowski KM, Cowan M, Harding PM. Alcohol Limits and Public Safety. *Forensic Sci Rev.* 2014 Jan;26(1):9-22. Review
- ⁸ Ferrario MM: Aspetti valutativi e gestionali del lavoratore con dipendenza da sostanze stupefacenti. *G Ital Med Lav*, 2008; 30(39, Suppl, 62-72
- ⁹ *Ramchand R, Pomeroy A, Arkes J: The effects of substance use on workplace injuries. Center For Health And Safety In The Workplace. Published 2009 by the RAND Corporation*

- ¹⁰ *Atti del convegno Alcol e Lavoro: analisi della situazione attuale e proposte per una normativa migliore. Villa Montalto, Firenze, 14 giugno 2010*
- ¹¹ F. Bortolotti e F. Tagliaro Biomarkers for the Identification of Alcohol Use/Abuse: A Critical Review. *Forensic Sci Rev.* 2011 Jul;23(2):55-72. Review
- ¹² Jones AW. Disappearance rate of ethanol from the blood of human subjects; implications in forensic toxicology. *Journal of Forensic Science* 1993; 38: 104-118
- ¹³ Jones AW. Biomarkers of acute and chronic alcohol ingestion. In: Garriott's medicolegal aspects of alcohol. Garriott JC and Aquayo EH eds Lawyers and Judges Publishing Company, Tucson, AZ, USA, 2008, pp. 157-203
- ¹⁴ Kaphalia BS, Cai P, Khan MF, Okorodudu AO, Ansari GAS: Fatty acid ethyl esters: markers of alcohol abuse and alcoholism. *Alcohol* 2004; 34: 151-158
- ¹⁵ Musshoff F: Chromatographic methods for the determination of markers of chronic and acute alcohol consumption. *Journal of Chromatography B* 2002; 781: 457-480
- ¹⁶ Tagliaro F, Bortolotti F, Ferrulli A, Nesci A, Caputo F, Addolorato G: Markers clinici e forensi di abuso alcolico. *Rassegne critiche. Bollettino sulle Dipendenze*, XXXIII, n. 1/2010: 41-53
- ¹⁷ Niemela O: Biomarkers in alcoholism. *Clinica Chimica Acta* 2007; 377: 39-49
- ¹⁸ De Jong G, Van Dijk JP, Van Eijk HG: The biology of transferrin. *Clin Chim Acta* 1990; 190: 1-46
- ¹⁹ Van Eijk HG, Van Noort WL, Kroos MJ, Van der Heul C: Analysis of the iron-binding sites of transferrin by isoelectric focusing. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1978; 16: 557-60
- ²⁰ Stibler H, Borg S: Evidence of a reduced sialic acid content in serum transferrin in male alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1981; 5: 545-9

- ²¹ Van Noort WL, De Jong G, Van Eijk HG: Purification of isotransferrins by concanavalin A Sepharose chromatography and preparative isoelectric focusing. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 885-92
- ²² Stibler H, Kjellin KG: Isoelectric focusing and electrophoresis of the CSF proteins in tremor of different origins. *J Neurol Sci* 1976; 30: 269-85
- ²³ Bortolotti F, De Paoli G, Tagliaro F: carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001-2005. *J. Chromatogr. B* 2006; 841: 96-109
- ²⁴ Tagliaro F, Crivellente F, Manetto G, Puppi I, Deyl Z, Marigo M: Optimized determination of carbohydrate-deficient transferrin isoforms in serum by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 1998; 19:3033-3039
- ²⁵ Crivellente F, Fracasso G, Valentini R, Manetto G, Riviera AP, Tagliaro F: Improved method for carbohydrate-deficient transferrin determination in human serum by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 2000; 739:81-93
- ²⁶ Jeppsson JO Kristensson H, Fimiani C: Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. *Clin Chem.* 1993 Oct; 39 (10): 2115-20
- ²⁷ Arndt T: Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis and interpretation. *Clinical Chemistry* 2001; 47: 13-27
- ²⁸ Sillanaukee P: Laboratory markers of alcohol abuse. *Alcohol and Alcoholism* 1996; 31: 613-616
- ²⁹ Bortolotti F, De Paoli G, Tagliaro F: Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001-2005. *Journal of Chromatography B* 2006; 841: 96-109

- ³⁰ Bortolotti F, Micciolo R, Canal L, Tagliaro F. First objective association between elevated carbohydrate-deficient transferrin concentrations and alcohol-related traffic accidents. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015 Nov;39(11):2108-14
- ³¹ Kenan N1, Husand S, Helander A. Importance of HPLC confirmation of problematic carbohydrate-deficient transferrin (CDT) results from a multicapillary electrophoresis routine method. *Clin Chim Acta*. 2010 Dec 14;411(23-24):1945-50. doi: 10.1016/j.cca.2010.08.006. Epub 2010 Aug 18.
- ³² Faller A, Richter B, Kluge M, Koenig P, Seitz HK, Thierauf A, Gnann H, Winkler M, Mattern R, Skopp G. LC-MS/MS analysis of phosphatidylethanol in dried blood spots versus conventional blood specimens. *Anal Bioanal Chem*. 2011;401(4):1163-6
- ³³ Hernández Redondo A, Schroeck A, Kneubuehl B, Weinmann W. Determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate from dried blood spots. *Int J Legal Med*. 2013;127(4):769-75
- ³⁴ Bertaso A, Sorio D, Vadoros A, De Palo EF, Bortolotti F, Tagliaro F. Use of finger-prick dried blood spots (fpDBS) and capillary electrophoresis for carbohydrate deficient transferrin (CDT) screening in forensic toxicology. *Electrophoresis*. 2016 37(21):2867-2874
- ³⁵ Sorio D, De Palo EF, Bertaso A, Bortolotti F, Tagliaro F. Fluorescent adduct formation with terbium: a novel strategy for transferrin glycoform identification in human body fluids and carbohydrate-deficient transferrin HPLC method validation. *Anal Bioanal Chem*. 2017;409(5):1369-1378

Sitografia

1A [<http://bdprofessioni.INAIL.it/bdp/jsp/reportCover.jsp?nup=7.4>]

2A [ILO-International Labour Organization: Management of alcohol and drug related issues in the workplace, 1996. http://www.ilo.org/public/libdoc/ilo/1996/96B09_297_engl.pdf]

3A[National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA), Alcohol Epidemiologic Data Directory. In: <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/datasys.htm>]